

ALYTES

INTERNATIONAL JOURNAL OF BATRACHOLOGY

January 2001

Volume 18, N° 3-4

Alytes, 2001, 18 (3-4): 97-126.

Review paper

Quatre décennies d'expérimentation embryologique chez les Amphibiens Urodèles

Charles HOUILLON

179 boulevard Voltaire,
75011 Paris, France

Manipulations of embryonic stages have been realised in species of salamanders (Amphibia, Urodela): the newts *Pleurodeles waltl* (Michahelles, 1830), *Pleurodeles poireti* (Gervais, 1835), *Triturus alpestris* (Laurenti, 1768), *Triturus helveticus* (Razoumowsky, 1789), *Triturus vulgaris* (Linné, 1758) and *Triturus cristatus* (Laurenti, 1768), and the axolotl, *Ambystoma mexicanum* (Shaw, 1789).

Tolerance or rejection of implants of embryonic tissues, such as skin grafts, depends on the degree of histocompatibility between the seven species. The axolotl acts as a "universal donor" for the other newts. The tolerance of presumptive gonadal primordia results in the emission of eggs of one species by another species.

The survival of heterospecific parabiotic pairs confirms the relative histocompatibility observed with skin grafts. The metamorphosis of axolotl forming a parabiosis with a *Triturus* species is caused by thyroid hypersecretion of the newt.

Of the 49 combinations forming potentially possible chimeras between embryos of the seven species, 4 allogenic combinations (chimeras between embryos of the same species) have actually been successfully realised (over 570 chimeras reaching from 4 months to 15 years of age), as well as 23 xenogenic combinations (chimeras of embryos of different species) (536 chimeras reaching from 3 months to 7 years of age). The allogenic chimeras are viable at the same level as normal animals. Chimera constructs of double body have two pairs of gonads. In homosexual combinations, the animals have either 4 functional ovaries or 4 functional testes (germinal chimeras). In heterosexual combinations, the interactions between gonads of different sexes depend on their relative position: free-martin effect (inhibition and even inversion of ovaries) is observed when the ovaries are anterior relative to testes. This effect is weak and often even absent when the ovaries are posterior relative to testes. In this case the development of posterior ovaries is scarcely modified by the anterior testes.

The survival of xenogenic chimeras depends on the species combination and on the direction of the association. A xenogenic chimera that reaches



the adult stage can show the sexual behaviour of the species that forms its anterior part and of the species that forms its posterior part.

Salamanders, showing only exceptionally spontaneous tumours, develop teratomas after implantation of embryos, allogenic or xenogenic, in the coelomic cavity of young larvae. Some of these experimental tumours remain benign, but others destabilise, becoming teratocarcinomas.

Ovaries taken from juvenile animals and transplanted into young animals, either castrated males or castrated females, can be indefinitely tolerated, even if they form xenotransplants.

The tolerance of axolotl ovaries by *Pleurodeles* allows the systematic emission of axolotl eggs by *Pleurodeles*. After artificial fertilisation, the eggs, which have completed their entire growth in a foreign organism, show an apparently normal development.

The relative histocompatibility of embryonic xenografts, the survival of parabiotic pairs and xenogenic chimeras, the free-martin effect of position in interactions between gonads, the formation and destabilisation of experimental teratomas are phenomena that remain unexplained.

The anatomical specimens arising from the described experiments are classified and stored in the collection of the Laboratoire des Reptiles et Amphibiens of the Muséum national d'Histoire naturelle, Paris.

SOMMAIRE

Abstract	97
Introduction	99
Matériel et méthodes	99
Greffes de téguments embryonnaires et d'ébauches présomptives	101
Allogreffes	101
Xéno-greffes	102
Parabioses	105
Allogéniques	105
Xéno-géniques	106
Chimères	108
Allogéniques	110
Xéno-géniques	111
Tératomes et tératocarcinomes expérimentaux	113
Allogéniques	115
Xéno-géniques	115
Transplantations ovariennes	118
Allogéniques	119
Xéno-géniques	119
Autres interventions embryonnaires	120
Organogenèse de la gonade	120
Formation du canal de Müller	121
Inversion du phénotype sexuel femelle par la température	121

Clonage du pleurodèle à partir du noyau des cellules germinales	121
Expérience "FERTILE"	122
Conclusions	122
Résumé	123
Remerciements	124
Références bibliographiques	125

INTRODUCTION

L'embryologie descriptive prit son essor à la suite des idées évolutionnistes à partir du dernier tiers du 19^e siècle. Elle fut aussitôt suivie par l'embryologie expérimentale, aussi appelée embryologie causale, dès la fin du même siècle. A ce propos, il est bon de rappeler CHABRY (1887), qui imagina le micromanipulateur pour détruire l'un des deux premiers blastomères de l'oeuf d'ascidie. Peu après, DRIESCH (1891) réussit à séparer les deux premiers blastomères de l'oeuf d'oursin. Mais, dès cette époque, l'oeuf d'amphibien s'imposa comme matériel particulièrement favorable pour les mêmes interventions précoces grâce à ROUX (1895) et l'école allemande. Faisant preuve de beaucoup d'audace pour l'époque, BORN (1897) tenta d'associer des héli-embryons afin de fabriquer des germes composites qui survécurent quelques semaines. Puis SPEMANN, par des manipulations encore plus fines sur l'oeuf de triton à propos de l'organogenèse de l'oeil (1901) et surtout avec la greffe de la lèvre dorsale du blastopore (1921), donna ses lettres de noblesse à l'embryologie expérimentale.

La faveur pour cette discipline ne s'est jamais démentie durant tout le 20^e siècle. C'est ainsi que BRIGGS & KING (1952) avec *Rana catesbeiana* furent les pionniers de la transplantation nucléaire. On oublie trop souvent que les premiers vertébrés clonés furent des amphibiens tant anoures qu'urodèles, il y a plus de 40 ans! A partir des années 1960, l'oeuf des mammifères trouva sa place de choix dans la discipline avec les souris tétraparentales de TARKOWSKI (1961) et de MINTZ (1962). Est-il besoin de rappeler la remarquable actualité de la greffe nucléaire qui vient d'être adaptée à l'oeuf de mammifère? Le clonage avec ses problèmes de toutes natures garantit de belles perspectives pour l'embryologie à l'aube du 21^e siècle.

Le propos de la présente revue concerne des greffes embryonnaires les plus diverses réalisées chez les amphibiens urodèles, avec comme originalité d'être pratiquées entre espèces différentes. De telles greffes sont encore irréalisables chez les mammifères.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'intérêt des amphibiens pour la microchirurgie embryonnaire tient à un ensemble d'avantages exceptionnels chez les vertébrés: (1) oeufs pondus en abondance (quelques dizaines pour les tritons, quelques centaines pour le pleurodèle et l'axolotl); (2) oeufs obtenus souvent en toutes saisons par injections hormonales (hormones gonadotropes ou mieux



encore, facteurs hypothalamiques); (3) oeufs relativement volumineux dont le diamètre est compris entre un et deux millimètres alors que l'oeuf de mammifère ne dépasse guère un dixième de millimètre; (4) possibilité de fécondation artificielle; (5) facilité d'accès à l'oeuf ou à l'embryon après dégantage; (6) développement en milieu externe d'où commodité d'une observation continue; (7) développement assez lent qui peut être légèrement ralenti ou accéléré en fonction de la température; (8) élevage facile une fois maîtrisés les paramètres relatifs à la nourriture et à la qualité de l'eau; (9) élevage des animaux expérimentaux jusqu'à l'état adulte ce qui permet d'envisager leur reproduction; toutefois, celle-ci n'est le plus souvent réalisable que vers l'âge de deux ans.

Les interventions sur les embryons ou les animaux juvéniles rapportées dans cet article ont été, pour la plupart, effectuées par l'auteur dans le laboratoire de Biologie Animale-Embryologie de l'Université Pierre et Marie Curie. Elles ont concerné sept espèces d'amphibiens urodèles dont six pour la famille des Salamandridae Goldfuss, 1820 (*Pleurodeles* et *Triturus*) et une pour la famille des Ambystomatidae Gray, 1850 (axolotl): *Pleurodeles waltl* (Michahelles, 1830), pleurodèle de Waltl (P.w.); *Pleurodeles poireti* (Gervais, 1835), pleurodèle de Poiret (P.p.); *Triturus alpestris* (Laurenti, 1768), triton alpestre (alp.); *Triturus helveticus* (Razoumowsky, 1789), triton palmé (palm.); *Triturus vulgaris* (Linné, 1758), triton commun (vulg.); *Triturus cristatus* (Laurenti, 1768), triton crêté (cr.); *Ambystoma mexicanum* (Shaw, 1789), axolotl (Ax.).

Avec l'axolotl on dispose de plusieurs souches dont la pigmentation dépend de deux couples de gènes alléomorphes, utilisables comme marqueurs pigmentaires pour suivre l'évolution des greffes (LESIMPLE et al., 1990):

- (1) souche "sauvage" (DA/DA): oeufs, embryons, larves et adultes pigmentés;
- (2) souche "blanche" (dA/dA): oeufs et embryons pigmentés, larves et adultes dépigmentés par suite de l'absence de migration et du non-étalement des cellules pigmentaires, en particulier des mélanophores;
- (3) souche "albinos sauvage" (Da/Da): oeufs et embryons albinos, larves et adultes jaunâtres par suite de la présence de xanthophores et d'iridophores mais absence de mélanophores (pas de synthèse de mélanine);
- (4) souche "albinos blanche" (da/da): oeufs, embryons, larves et adultes dépigmentés.

La terminologie employée est celle propre aux greffes en immunologie: les allogreffes ou greffes allogéniques sont des interventions entre individus de la même espèce et les xénogreffes ou greffes xénogéniques sont des interventions entre individus d'espèces différentes. Par exemple, le terme "allogénique" sera employé pour des interventions entre embryons d'axolotl même s'ils sont de souches différentes et le terme "xénogénique" sera employé pour des interventions entre embryons d'axolotl et embryons de tritons.

Les différentes souches d'axolotl et les deux espèces de pleurodèles sont élevées en permanence au laboratoire. En revanche, les différentes espèces de tritons proviennent directement de la nature où elles sont récoltées au printemps; ces animaux sont remis dans leurs mares d'origine quelques mois plus tard, après avoir servi de progéniteurs.

La technique opératoire sera précisée à propos de chaque type d'intervention. La méthode générale relève de la microchirurgie embryonnaire classiquement appliquée aux

amphibiens. Le maximum d'asepsie est requis en particulier la stérilisation des milieux physiologiques opératoires (milieu de Holtfreter et milieu de Steinberg). Les interventions se font dans des coupelles opératoires sur fond de gélose ou plus commodément sur fond de pâte à modeler et en utilisant une loupe binoculaire aux grossissements 10, le plus souvent 16, mais rarement davantage. Les instruments destinés aux interventions sur les embryons sont de simples fils de platine (diamètre 3 ou 4 centièmes de millimètre) emmanchés sur des tubes de verre.

Les interventions sur les embryons se pratiquent au stade du bourgeon caudal, avant la réponse musculaire, les germes étant âgés de 4 à 5 jours selon les espèces et la température ambiante. Seuls sont gardés les embryons parfaitement cicatrisés 24 heures après l'opération. Ils séjournent ensuite pendant 3 à 5 jours dans le milieu d'élevage (liquide opératoire dilué au 1/10 dans l'eau ordinaire). Après quoi, ils peuvent être mis définitivement dans l'eau ordinaire car ils atteignent pratiquement le stade de l'éclosion tout comme s'ils étaient demeurés dans les conditions naturelles. La première alimentation intervient environ 8 jours plus tard.

Dans la plupart des cas, l'analyse ne porte que sur les animaux expérimentaux qui survivent au moins jusqu'à l'âge de trois mois, ce qui correspond le plus souvent à l'époque de la métamorphose. L'élevage se poursuit le plus longtemps possible, au moins jusqu'à l'état adulte mais parfois pendant plus de dix années.

La pratique de la microchirurgie embryonnaire des amphibiens ne demande guère d'aptitudes particulières si ce n'est une certaine dextérité, beaucoup de persévérance pour refaire maintes fois le même type d'expérience et surtout une grande disponibilité afin de pouvoir utiliser en temps utile des embryons appartenant à des espèces différentes et aux stades opératoires convenables. Il est nécessaire de bien connaître les conditions de reproduction des progéniteurs lorsqu'on désire disposer d'une ponte de pleurodèle en même temps que d'une ponte d'axolotl ou de triton, ou encore disposer simultanément de plusieurs pontes d'axolotl provenant de souches différentes. La connaissance de la chronologie du développement de chaque espèce est indispensable. Dans l'exposé ci-dessous, le mot "pleurodèle", utilisé seul, se rapporte à *Pleurodeles waltl*, espèce la plus fréquemment utilisée dans nos expériences.

GREFFES DE TÉGUMENTS EMBRYONNAIRES ET D'ÉBAUCHES PRÉSOMPTIVES

ALLOGREFFES

L'intervention la plus banale consiste à prélever un lambeau de tégument sur un embryon pour le greffer sur un autre embryon après avoir éliminé le territoire équivalent. Il s'agit d'une allogreffe qui peut être réalisée entre un embryon d'axolotl de la souche albinos (embryon donneur dépigmenté) et un embryon de la souche blanche (embryon receveur pigmenté) (fig. 1). Par la suite, l'embryon receveur évolue en larve puis en adulte "blanc" car les mélanophores bien que présents ne migrent pas et ne s'étalent pas. En revanche, le greffon "albinos", qui originellement ne possédait pas de mélanophores, va se pigmenter intensément car, possédant un substrat convenable, il attire les mélanophores de l'hôte qui peuvent s'étaler :

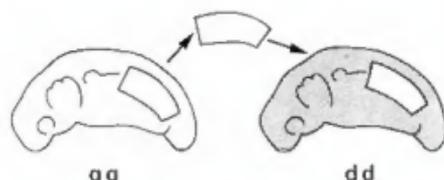


Fig. 1. – Allogreffe de tégument et d'ébauche gonadique présomptive entre un embryon d'axolotl de la souche albinos (aa) et un embryon de la souche blanche (dd) (voir *Matériel et méthodes* pour la définition de ces souches).

un greffon "albinos" sur un hôte "blanc" devient très rapidement noirâtre (fig. 4). Et pourtant le greffon garde bien sa structure albinos originelle! En effet, en même temps que le tégument, on peut greffer la partie sous-jacente qui correspond à l'ébauche présomptive de la gonade. Si on se trouve dans le cas particulier, réalisé une fois sur quatre, d'une ébauche présomptive ovarienne "albinos" greffée sur un embryon femelle "blanc", l'ébauche greffée évolue en ovaire tout comme la gonade de l'hôte située du côté non-opéré. Cet axolotl femelle blanc possède un ovaire avec des ovocytes pigmentés du côté non-opéré et un ovaire avec des ovocytes albinos du côté opéré. Finalement un tel animal peut pondre, en même temps que ses propres oeufs pigmentés, des oeufs dépigmentés provenant de la greffe ovarienne (fig. 5) (HOUILLOIN & BAGNARA, 1996).

Une sorte de contre-épreuve de l'expérience ci-dessus est apportée par l'allogreffe de crête neurale dont sont issues les cellules pigmentaires. Un fragment de crête neurale prélevé sur une neurula de la souche blanche peut être greffé à l'emplacement équivalent d'une neurula de la souche albinos (fig. 2). L'embryon hôte évolue normalement en larve puis en adulte albinos mais, peu avant le stade de l'éclosion, on observe l'apparition de mélanophores au voisinage puis ultérieurement assez loin de la greffe. L'hôte albinos se trouve plus ou moins localement pigmenté par les mélanophores issus du greffon blanc qui trouvent dans cet hôte le substrat nécessaire à leur migration et à leur étalement. Ainsi, un axolotl albinos peut être partiellement pigmenté par une allogreffe de crête neurale de la souche blanche (fig. 6). Des phénomènes migratoires comparables s'observeront chez les chimères allogéniques entre les axolotls de la souche blanche et les axolotls de la souche albinos.

XÉNOGREFFES

Les xénogreffes de téguments embryonnaires sont réalisables selon le même protocole que les allogreffes entre le pleurodèle, l'axolotl et les tritons (fig. 3). L'hôte poursuit son développement normal et le greffon se différencie conformément à son origine, mais son évolution à plus long terme dépend du sens de la greffe.

Le cas le plus remarquable, encore inexpliqué, est la tolérance parfaite et indéfinie des xénogreffes embryonnaires d'axolotl aussi bien sur le pleurodèle (fig. 7) que sur les diverses espèces de tritons. A l'inverse, les xénogreffes embryonnaires de pleurodèle aussi bien que de

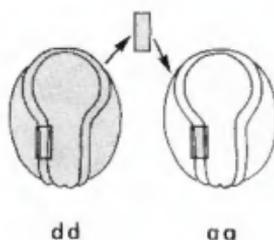


Fig. 2. – Allogreffe de crête neurale d'une neurula d'axolotl de la souche blanche (dd) sur une neurula de la souche albinos (aa).

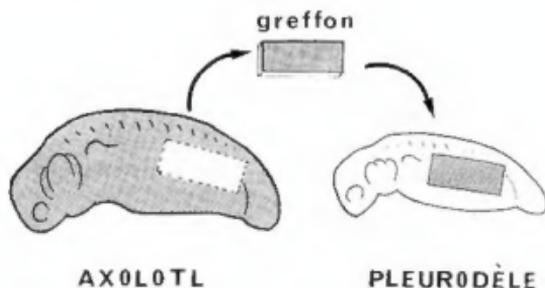
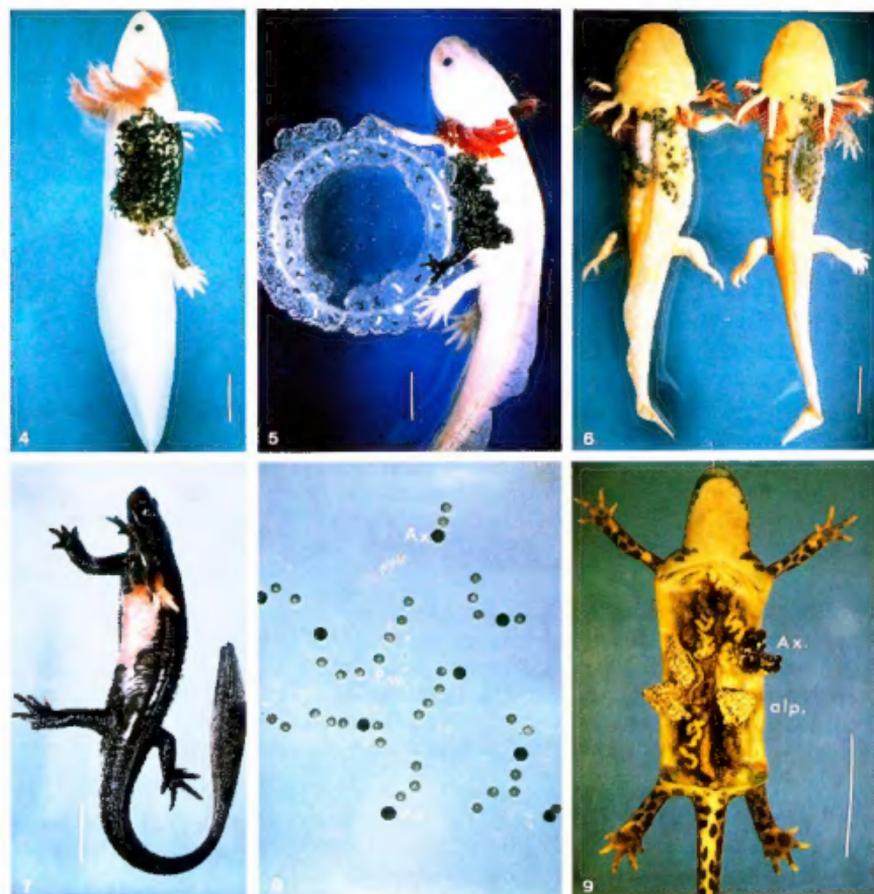


Fig. 3. – Xénogreffe de tégument et d'ébauche gonadique présomptive entre un embryon d'axolotl et un embryon de pleurodèle.

tritons sont inéluctablement rejetées par l'axolotl après une tolérance de quelques mois. Le rejet des xénogreffes embryonnaires par l'axolotl peut intervenir brutalement en quelques jours, entraînant la mort de l'hôte. Dans les autres cas, surtout entre le pleurodèle et les tritons, le rejet intervient plus ou moins lentement, permettant aux téguments rejetés d'être progressivement remplacés par les téguments de l'hôte.

Il découle de cette étude la notion d'"histocompatibilité relative" entre les différentes espèces d'urodèles, qui va en décroissant dans le sens axolotl, triton palmé, triton alpestre, pleurodèle (HOULLON, 1967; HOULLON et al. 1969). L'axolotl peut être considéré comme "donneur universel" pour les xénogreffes embryonnaires, mais il ne tolère que les allogreffes embryonnaires, c'est-à-dire de sa propre espèce.

La tolérance pour les xénogreffes de téguments embryonnaires se retrouve pour les xénogreffes d'ébauches présomptives. Ainsi, en même temps que les téguments d'axolotl, on peut prélever l'ébauche présomptive sous-jacente de la gonade (HOULLON, 1973). Dans le cas particulier où il s'agit d'une ébauche ovarienne greffée sur un embryon femelle de pleurodèle ou de triton, cette ébauche se différencie en ovaire tout comme la gonade de l'hôte située du



Greffes de téguments embryonnaires et d'ébauches gonadiques présomptives.
Barre = 20 mm.

Fig. 4. – Greffe allogénique de tégument embryonnaire d'axolotl "albinos" sur un axolotl "blanc". Les mélanophores de l'hôte "blanc", qui ne migrent pas et ne s'étalent pas, sont "attirés" dans le greffon "albinos" où ils peuvent s'étaler (12 mois, 190 mm).

côté non-opéré. On obtient un pleurodèle ou un triton femelle qui possède un ovaire normal du côté non-opéré et un ovaire d'axolotl du côté opéré (fig. 9). Le pleurodèle pondra en même temps ses propres oeufs et des oeufs d'axolotl (fig. 8), mais les oeufs d'axolotl sont trop gros pour être pondus par un triton.

PARABIOSES

ALLOGÉNIQUES

La greffe en parabiose (BURNS, 1925) consiste à souder deux embryons entiers (fig. 10) pour établir une circulation croisée entre deux animaux afin de mimer le phénomène freemartin des Bovides. Lorsqu'une vache donne naissance à deux veaux de sexe différent, par la suite le mâle peut procréer normalement dans la majorité des cas alors que la femelle est le plus souvent stérile. L'interprétation de ce phénomène (LILLIE, 1916) est qu'à la suite d'une fusion placentaire des anastomoses vasculaires s'établissent très précocement, permettant une circulation croisée entre les deux foetus. Or, comme la différenciation sexuelle mâle s'effectue la première, les facteurs responsables de cette différenciation diffusent dans le jumeau femelle, inhibant la différenciation des ovaires et même provoquent leur masculinisation.

La soudure de deux embryons d'amphibiens peut se faire latéralement au niveau des flancs (parabiose proprement dite) (fig. 11-13) ou par les extrémités caudales (telobiose)

Fig 5 Greffe allogénique de tegument et d'ébauche ovarienne présomptive d'axolotl "albinos" sur un axolotl femelle "blanc". L'hôte "blanc" pond des oeufs pigmentés provenant de l'ovaire situé du côté non-opéré et des oeufs dépigmentés provenant du greffon ovarien tolère (12 mois, 190 mm, photographie 8 jours après la ponte)

Fig 6 Allogreffes de crête neurale d'axolotl "blanc" sur des axolotls "albinos". Les melanophores d'axolotl blanc trouvent dans les axolotls "albinos" le substrat nécessaire à leur migration et à leur étallement. Le greffon "blanc", non pigmenté, est bien visible sur l'animal de gauche, légèrement en arrière de la tête et à gauche (2 ans, 190 mm). Un axolotl "albinos" peut être pigmenté par une greffe d'axolotl "blanc".

Fig 7 Greffe xenogénique de tegument d'axolotl blanc sur le pleurodèle. Tolerance indéfinie des xenogreffes embryonnaires d'axolotl sur le pleurodèle (4 ans, 180 mm)

Fig 8 Ponte simultanée d'oeufs de pleurodèle (Pw), les plus nombreux et les plus clairs (1-4 mm) et d'oeufs d'axolotl (Ax), les plus gros et les plus foncés (1-8 mm) par un pleurodèle femelle qui a toléré une ébauche ovarienne présomptive d'axolotl.

Fig 9 Dissection d'un triton alpestre femelle qui avait reçu une xenogreffe embryonnaire d'ébauche ovarienne présomptive d'axolotl indéfiniment tolérée. Du côté droit non-opéré ovaire de triton alpestre à maturité sexuelle. Du côté gauche greffe, ovaire d'axolotl (Ax) à maturité sexuelle ainsi qu'un élément ovarien postérieur de triton alpestre (alp). Les ovocytes d'axolotl sont trop volumineux pour pouvoir transiter dans les oviductes de triton alpestre (7 ans, 100 mm)

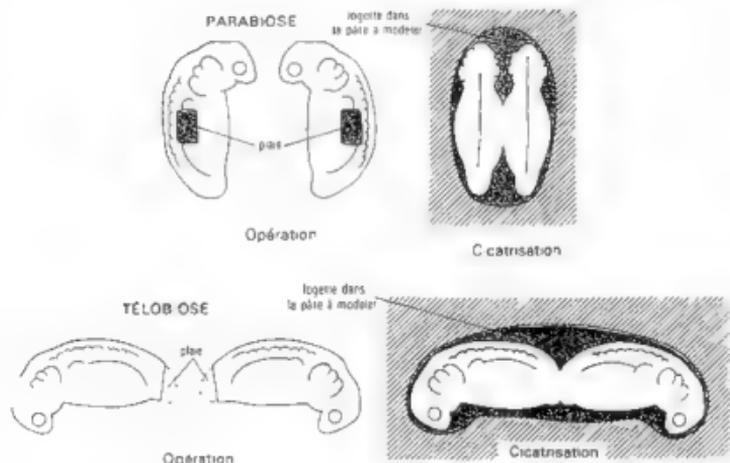


Fig 10 – Principe de la greffe en parabiose entre deux embryons de pleurodele.

(fig 14-15). La parabiose allogénique, plus communément appelée parabiose homospécifique, est assez facilement réalisable chez le pleurodele, l'axolotl et le triton alpestre. Les paires parabiontiques ont un développement normal: certaines parabioses pleurodele/pleurodele ont survécu plus de six ans. Cependant des anastomoses digestives dues à une soudure trop intime des deux parabiontes abrègent souvent la survie.

XÉNOGÉNIQUES

La survie des parabioses xenogéniques est nettement plus brève que celle des parabioses allogéniques et dépend des espèces associées. Le maximum observé a été de trois ans pour

Parabioses allogéniques.

Barre = 20 mm, sauf pour la fig. 11

Fig 11 Parabiose entre un embryon d'axolotl de la souche albinos (aa) et un embryon de la souche blanche (dd), 24 heures après l'opération

Fig 12 Parabiose entre un axolotl de la souche albinos (aa) et un axolotl de la souche blanche (dd) Noter la migration au niveau de la soudure des melanophores de l'axolotl blanc qui se sont et les localement dans le parabionte albinos (2 ans, 180 mm)

Fig 13 Parabiose entre deux tritons alpestres (1 an, 85 mm)



Fig. 14 – Télubiose entre un axolotl de la souche sauvage (DD) et un axolotl de la souche blanche (dd) (5 ans)

Fig. 15 – Télubiose entre deux pleurodeles (6 ans)

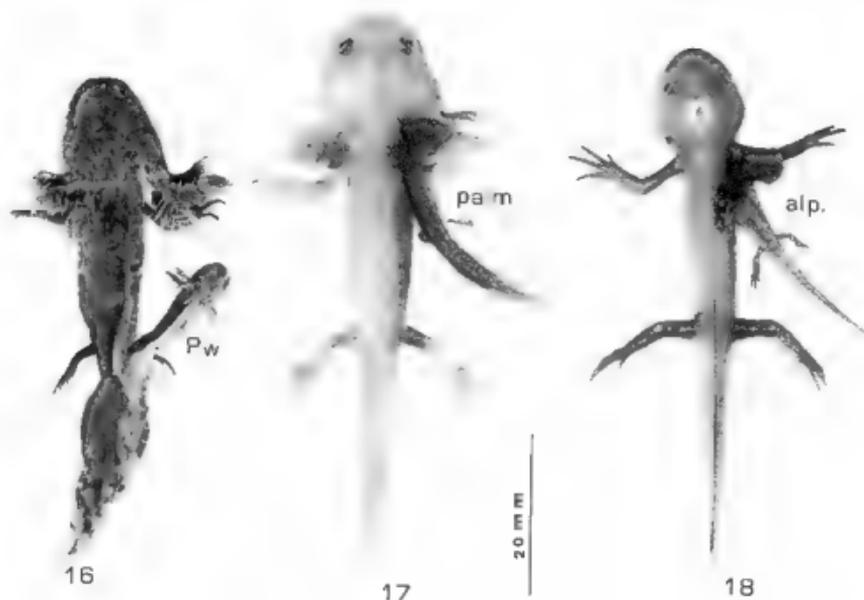
des parabioses pleurodèle/triton alpestre. La métamorphose, légèrement plus tardive par rapport aux conditions normales, est rigoureusement synchrone pour les deux parabiontes. A cette époque ou peu après, l'un des parabiontes est souvent victime de phénomènes de rejet de la part de son partenaire et sa nécrose entraîne la létalité de l'association. La tolérance dans la parabiose xénogénique relève de la même histocompatibilité relative que celle rencontrée pour les xénogreffes embryonnaires (HOULLON, 1966). Par exemple, les parabioses entre les différents tritons, assez proches du point de vue de l'histocompatibilité, ont une longévité bien supérieure aux parabioses entre l'axolotl et le pleurodèle peu histocompatibles (fig. 16).

L'effet free-martin se manifeste dans les parabioses xénogéniques hétérosexuées comme dans les parabioses allogéniques hétérosexuées, mais son analyse est beaucoup plus délicate. En plus des phénomènes d'histocompatibilité interviennent d'autres paramètres tel que le volume des gonades quand une espèce de grande taille est mise en parabiose avec une espèce de petite taille, de même que les différences d'ordre chronologique de la différenciation sexuelle d'une espèce par rapport à l'autre.

L'observation la plus remarquable concerne les parabioses entre l'axolotl, habituellement néoténique, et les tritons alpestre ou palmé (fig. 17), qui se métamorphosent naturellement vers l'âge de dix semaines. Lorsque de telles associations survivent assez longtemps, la métamorphose intervient en quelques jours et d'une manière parfaitement synchrone pour les deux parabiontes vers l'âge de dix mois. L'étude histologique a révélé que la thyroïde du triton était hyperactive alors que la thyroïde de l'axolotl demeurait dans le même état que celle d'un axolotl néoténique (CHARLEMAGNE & HOULLON, 1966). Ceci signifie que le complexe hypophyse-thyroïde du triton est hyperfonctionnel afin d'assurer en même temps la métamorphose des deux parabiontes, cependant que le complexe hypophyse-thyroïde de l'axolotl demeure au repos. La sécrétion thyroïdienne du triton doit être particulièrement abondante pour provoquer d'une part sa propre métamorphose et d'autre part celle de l'axolotl souvent six à dix fois plus volumineux (fig. 18).

CHIMÈRES

Entre la greffe d'une ébauche embryonnaire et la soudure de deux embryons complets, il existe un moyen terme qui consiste à prendre deux héli-embryons pour reconstituer un embryon composite. L'animal ainsi obtenu est une "chimère" au vrai sens étymologique. Chez un tel animal on ne peut pas définir quelle est la partie "donneur" par rapport à la partie "receveur", on ne discerne pas le greffon de l'hôte. La greffe embryonnaire en chimère consiste à sectionner transversalement deux embryons au stade du bourgeon caudal puis à associer la partie antérieure de l'un avec la partie postérieure de l'autre (fig. 19). Selon l'importance de chaque héli-embryon on réalise une chimère à corps simple lorsque les parties antérieure et postérieure sont complémentaires mais, à la limite, on réalise des chimères à corps double quand on associe un embryon dont on a éliminé le bourgeon de queue avec un embryon dont on a éliminé la tête. Toutes les associations entre ces deux extrêmes sont concevables (CHARLEMAGNE & HOULLON, 1974).



Parabioses xénogéniques.
Barre= 20 mm.

Fig 16 Telobiose entre un axolotl et un pleurodèle (Pw) Le pleurodèle (à droite) est en cours de rejet (5 mois, axolotl 60 mm)

Fig 17 Parabiose xénogénique, non métamorphosée entre un axolotl blanc et un triton palmé (palm) (7 mois, axolotl 70 mm)

Fig 18 Axolotl métamorphosé de la souche blanche en parabiose avec un triton alpestre (alp) (12 mois, axolotl 70 mm)

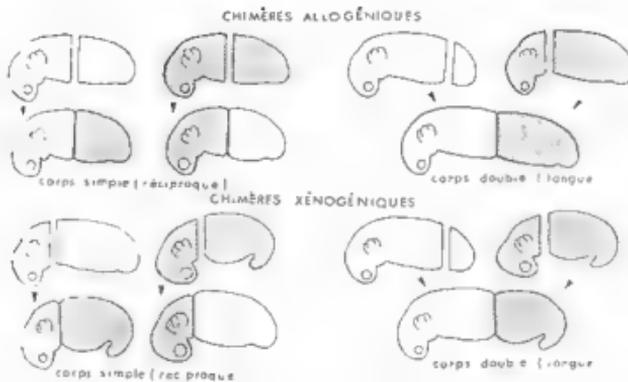


Fig 19 - Principe de la greffe en chimère a corps simple et a corps double entre embryons de la même espèce (chimères allogéniques) et entre embryons d'espèces différentes (chimères xénogéniques)

Depuis les premières chimeres obtenues au cours des années 1960 (HOUILLO, 1964a-b, 1965) jusqu'aux dernières réalisées avec trois tronçons d'embryons différents (fig. 20) (trichimères, HOUILLO, 1984), les associations les plus diverses ont été réalisées. A partir de sept espèces différentes d'urodeles, on peut concevoir 49 associations chimeres à corps simple comme à corps double. Il y a théoriquement sept associations allogéniques dont quatre ont effectivement été réalisées avec *P. waltl*, *P. poireti*, *T. alpestris* et *A. mexicanum*. Sur 42 associations xénogéniques théoriquement concevables, 23 ont effectivement été réalisées (HOUILLO, 1999).

Une chimère est désignée par l'abréviation de sa partie antérieure et l'abréviation de sa partie postérieure par exemple, "Pw.-Pw" est une chimère allogénique partie antérieure *P. waltl*-partie postérieure *P. waltl*. "Pw.-alp" est une chimère xénogénique partie antérieure *P. waltl*-partie postérieure *T. alpestris*. "alp.-Pw" est une chimère xénogénique inverse de la précédente.

ALLOGÉNIQUES

Des que la prise de nourriture est assurée, soit une quinzaine de jours après l'opération, les chimeres allogéniques a corps simple et a corps double ont une viabilité comparable à celle des animaux témoins, et 50% d'entre elles atteignent l'âge d'un an. De nombreuses chimeres allogéniques ont vécu plus de quatre mois : plus de 300 Pw.-Pw (fig. 22), plus de 150 Ax.-Ax (fig. 23-25), 90 alp.-alp. et 30 Pp.-Pp. L'âge maximum atteint par ces chimeres a été respectivement de 15, 10, 6 et 5 ans.

Les chimeres allogéniques ont été surtout réalisées en vue d'analyser les interactions entre glandes génitales, plus particulièrement chez les animaux à corps double (HOUILLO & CHARLEMAGNE, 1971; HOUILLO et al., 1973; HOUILLO, 1977-2000; HOUILLO & DOURSON,

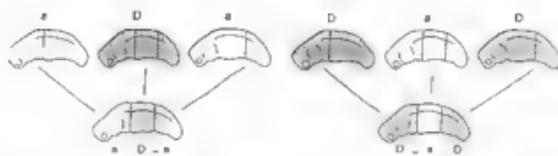


Fig 20 Trichimères entre embryons d'axolotl de la souche albinos (a) et embryons de la souche sauvage (D)

1986) (fig. 21). Dans la combinaison homosexuée femelle antérieur-femelle postérieur (\varnothing - \varnothing), les chimères sont pourvues de quatre ovaires, et dans la combinaison homosexuée mâle antérieur-mâle postérieur (δ - δ), les chimères ont en général quatre testicules. Le point le plus intéressant concerne les combinaisons hétérosexuées car il s'agit d'animaux bien viables chez lesquels des laparotomies successives au cours de leur existence permettent de suivre l'évolution du tractus uro-génital. Le résultat essentiel, mais imprévu et encore inexpliqué, est que l'effet free-martin dépend de la position des ovaires par rapport aux testicules ainsi qu'il est résumé dans le tableau 1 (HOULLON, 2000)

Dans la combinaison hétérosexuée femelle antérieur-mâle postérieur (\varnothing - δ), les ovaires antérieurs sont totalement inhibés (fig. 28) et peuvent même être inversés en testicules sous l'effet des testicules postérieurs normaux. Dans la combinaison hétérosexuée mâle antérieur-femelle postérieur (δ - \varnothing), les testicules antérieurs normaux inhibent peu l'évolution ovarienne postérieure, à un tel point que l'on observe des animaux hermaphrodites avec des testicules antérieurs et des ovaires postérieurs à maturité sexuelle (fig. 29).

Certaines associations allogéniques pour les combinaisons homosexuées sont des "chimeres germinales", c'est-à-dire qu'elles peuvent émettre à la fois les gamètes en provenance de la partie antérieure et les gamètes en provenance de la partie postérieure. Ceci a été observé pour des chimères femelles Ax-Ax (\varnothing - \varnothing), qui pondaient en même temps des œufs albinos issus des ovaires antérieurs et des œufs pigmentés issus des ovaires postérieurs. De même, à partir de croisements appropriés en utilisant les marqueurs de la pigmentation, il a été démontré que les chimères mâles Ax-Ax (δ - δ) mettaient en même temps les spermatozoïdes issus des testicules antérieurs et les spermatozoïdes issus des testicules postérieurs.

XENOGÉNIQUES

Plus délicates à réaliser par suite de la différence de taille des embryons et surtout à cause des degrés d'histocompatibilité, les chimères xénogéniques ont une longévité bien moindre que les chimères allogéniques. Ainsi, s'il est relativement commode de réaliser des chimères entre pleurodèles et tritons (fig. 24), la plupart des chimères entre pleurodèles et axolotls, comme pour les parabioses, sont difficilement viables. D'une manière générale, seulement 20% des animaux bien cicatrisés le lendemain de l'opération atteignent l'époque de la métamorphose vers 3 mois et cet âge également pour les chimères avec une partie antérieure axolotl qui ne se métamorphosent jamais (fig. 26). Sur les 536 chimères xénogéniques prises en

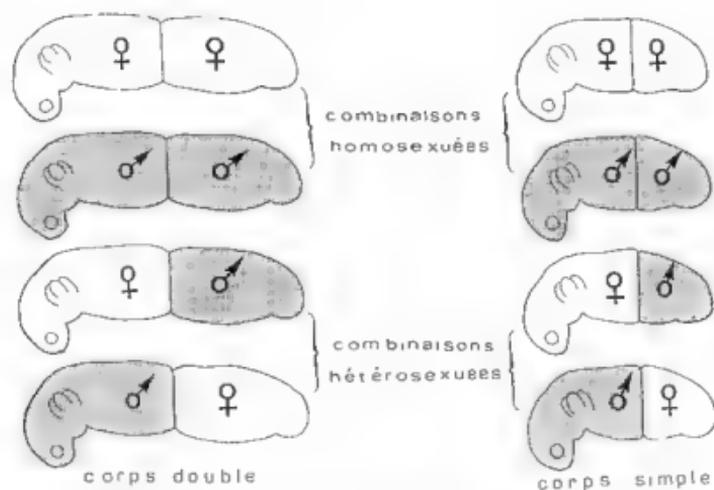


Fig. 21 — Combinaisons sexuelles chez les chimères allogéniques à corps double et à corps simple

Tableau I — Interaction entre glandes génitales de sexe différent chez les Urodèles chimères.

Combinaison sexuelle	Type de chimère	Partie antérieure	Partie postérieure
♀-♂	Corps double	Forté inhibition ovarienne ou inversion ovarienne	Testicules normaux
	Corps simple	Inversion ovarienne	Testicules normaux
♂-♀	Corps double	Testicules normaux	Inhibition ovarienne ± faible ou rare inversion
	Corps simple	Testicules normaux ou légère réduction	Inhibition ovarienne + faible ou fréquente inversion

compte à partir de trois mois, il en restait 181 à un an (34 %) mais seulement 23 (4,3 %) à l'âge de quatre ans (HOULLON, 1999).

L'analyse des interactions dans la sphère uro-génitale est aussi délicate que pour les parabioses xénogéniques car en plus les retards de croissance sont fréquents. A ce sujet, il a été remarqué que la taille des chimères xénogéniques demeurait harmonieuse même quand une espèce de grande taille, par exemple le pleurodèle, était associée avec une espèce de petite taille, par exemple le triton vulgaire. La partie à laquelle appartient l'espèce de grande taille semble ralentir sa croissance pour s'adapter à la partie qui appartient à une espèce de petite taille (fig. 27)

La maturité sexuelle n'a pas encore été observée chez les chimères xénogéniques à corps double, mais elle a été souvent observée chez les chimères xénogéniques à corps simple. Notons que par suite de la technique opératoire, le prélèvement de la partie antérieure se faisant toujours en avant de la région génitale présomptive, ces animaux ne possèdent que les gonades de la partie postérieure. Une fois adultes, les chimères xénogéniques à corps simple ne seront jamais "germinales" puisque leurs gamètes ne peuvent provenir que de leur partie postérieure. Sur 268 chimères xénogéniques à corps simple, pres de 20 % ont atteint la maturité sexuelle dont 25 mâles sur 136 et 26 femelles sur 132.

Le comportement sexuel de ces chimères est particulièrement remarquable. C'est ainsi qu'une chimère P.w.-alp. (partie antérieure *P. waltii* partie postérieure *T. alpestris*) âgée de deux ans, mise en présence d'un pleurodèle femelle, s'est accouplée avec cette femelle selon l'amplexus classiquement observé chez *Pleurodeles* dans les conditions naturelles. Ensuite, remise en présence d'un triton alpestre femelle, il n'y a pas eu d'amplexus mais des ondulations de la queue comme lors de la parade nuptiale chez les tritons. Ainsi une chimère xénogénique adulte peut manifester successivement le comportement sexuel propre à l'espèce de sa partie antérieure et le comportement sexuel propre à l'espèce de sa partie postérieure (HOULLON, 1992)

TÉRATOMES ET TÉRATOCARCINOMES EXPÉRIMENTAUX

Les tumeurs spontanées sont peu fréquentes chez les amphibiens et en particulier chez les urodèles. Depuis un demi-siècle que le pleurodèle est d'un usage courant comme matériel biologique, le seul cas rapporté est celui d'une tumeur maligne entretenue par des transplantations successives durant près de cinq années dans notre laboratoire (PLAÇAIS, 1974). La rareté des tumeurs naturelles tout comme la difficulté à induire des tumeurs par les substances cancérigènes chez les urodèles ont conduit à rechercher la capacité du pleurodèle et de l'axolotl à produire des tératomes, voire des tératocarcinomes, de la même manière que chez la souris de telles formations sont obtenues après l'implantation d'embryons en des sites extra-utérins.

Le principe de l'opération consiste, après anesthésie, à pratiquer une légère incision sur le flanc de l'animal receveur, puis à inoculer trois à six embryons dans la cavité générale (fig. 34). Les animaux opérés sont des larves âgées de 7 à 8 semaines pour les plus jeunes (40 mm)



Chimères

Barre = 20 mm

Fig 22 Chimère allogénétique *P walt* *P walt* (Pw-Pw), mâle à corps presque double avec duplication des membres intermédiaires (4 ans, 220 mm) Les membres intermédiaires sont les membres antérieurs (quatre doigts) de la partie postérieure

Fig 23 Paire de chimères allogénétiques à corps simple (chimères réciproques) entre axolotls de la souche blanche (dd) et axolotls de la souche albinos (aa) Les plages pigmentaires au niveau des parties blanches (12 mois, 155 mm)

jusqu'à des individus âgés de 4 à 5 mois (65 à 85 mm), ce qui correspond pour le pleurodele à des animaux métamorphosés.

Les embryons implantés vont des stades de la segmentation aux stades proches de l'éclosion. Une fois dégangés, les embryons sont inoculés à l'aide d'une pipette de verre calibrée à la taille des implants. Des points de suture sont indispensables pour refermer l'incision et éviter l'expulsion des embryons. La principale difficulté est d'éviter l'écrasement des jeunes embryons dégangues particulièrement fragiles jusqu'au stade du jeune bourgeon caudal. La mortalité post-opératoire est pratiquement nulle. Les animaux opérés sont sacrifiés entre trois mois et quatre ans après l'opération. La présence de tératomes se détecte à la suite d'une laparotomie mais bien souvent la simple palpation permet de percevoir la présence de nodules tumoraux.

ALLOGÉNIQUES

Sur 245 pleurodeles larvaires ou métamorphosés ayant reçu des implants embryonnaires de pleurodele, 97 ont présenté des tératomes ou des tératocarcinomes (fig. 31), et sur 76 axolotls juvéniles ayant reçu des implants embryonnaires d'axolotl, 69 avaient développé également des tératomes ou des tératocarcinomes (fig. 32). Ainsi 40 % des pleurodèles et jusqu'à 90 % des axolotls peuvent développer des tératomes ou des tératocarcinomes allogéniques (HOULLON, 1988).

XÉNOGÉNIQUES

Des embryons d'axolotl ont été implantés dans la cavité générale de pleurodèles, de même que des embryons d'axolotl en même temps que des embryons de pleurodele. Sur un total de 287 opérations, 194 pleurodeles, soit 68 %, ont développé des tératomes ou des tératocarcinomes xénogéniques (fig. 33) (HOULLON, 1989).

Fig. 24 Remarquable chimère xénogénique à corps double *P. waltl* - *T. helveticus* (Pw-palm), opération le 6 juin 1961, chimère morte le 7 août 1965 (50 mois, 85 mm)

Fig. 25 Axolotl trichimère : partie antérieure albinos (aa) - partie moyenne sauvage (DD) - partie postérieure albinos (aa) (9 mois, 150 mm). Métamorphose spontanée à 6 mois, mort à 13 mois. Pas de migration des melanophores DD dans la partie antérieure aa mais légère migration des melanophores DD dans la partie postérieure aa

Fig. 26 Vases ventrales de chimères xénogéniques entre *T. alpestris* (alp.) et axolotls de la souche sauvage (Ax). A gauche la chimère a.p.-Ax âgée de 6 mois (56 mm), s'est métamorphosée à 3 mois à côté de la chimère Ax-alp. âgée de 6 mois est restée néoténique (72 mm)

Fig. 27 Vases ventrales de chimères xénogéniques entre *T. vulgaris* (vulg.) et *P. waltl* (Pw). A gauche, chimère vulg.-Pw (22 mois, 92 mm), à droite chimère mâle Pw-vulg. à maturité sexuelle (22 mois, 70 mm)



Tractus uro-génital et teratomes.
Barre= 20 mm

Fig 28 - Chânière alogénétique à corps double *P. aulif* - *P. aulif* (Pw-Pw) de la combinaison hétérosexuée femelle antérieure - mâle postérieure (1-2) inhibition totale des ovaires antérieurs (0 a) (effet free martin) et testicules postérieurs normaux (1 p). Les corps jaunes adipeux antérieurs et postérieurs n'ont pas été enlevés (32 mois, 220 mm)

Des embryons de pleurodele ont été implantés dans la cavité générale d'axolotls, de même que des embryons de pleurodele en même temps que des embryons d'axolotl. Sur un total de 44 opérations, 9 axolotls (20 %) ont développé des tératomes xénogéniques. Un seul cas de tératome xénogénique sur 35 opérations a été observé à la suite de l'implantation d'embryons de triton alpestre chez le pleurodele. Par contre, 19 cas de tératomes xénogéniques sur 31 opérations (61 %) ont été observés à la suite de l'implantation d'embryons de triton alpestre chez l'axolotl.

Les différents pourcentages de tératomes ou de tératocarcinomes xénogéniques obtenus chez le pleurodele, l'axolotl et le triton alpestre s'interprètent facilement par les différents degrés d'histocompatibilité entre ces urodeles, au même titre que pour les greffes embryonnaires, les parabioses et les chimères xénogéniques. Plusieurs nodules de tératome s'observent le plus souvent chez un même animal puisque plusieurs embryons sont inoculés en même temps mais parfois il n'existe qu'un seul nodule. Dans ce cas il s'agit d'un "tératome chimère" surtout lorsqu'il provient de l'implantation simultanée d'embryons d'espèces différentes.

Les tératomes se classent en trois catégories selon leur importance. Une première catégorie concerne ceux dont la croissance est à peine marquée, leur poids correspond à moins de 1 % du poids de l'hôte. Une deuxième catégorie concerne les tératomes qui évoluent au même rythme que l'hôte; ils peuvent atteindre au maximum 4 à 5 % du poids de l'hôte. Pour une troisième catégorie la croissance paraît incontrôlée, ils dépassent 10 % et parfois jusqu'à 40 % du poids de l'hôte (fig. 31-32). Ces tératomes sont "déstabilisés", leur croissance anarchique provoque la cachexie et finalement la mort de l'hôte. De telles tumeurs destabilisées peuvent être considérées comme malignes ce sont des tératocarcinomes. Elles affectent davantage les implants d'embryons d'axolotl (30 à 40 % des tératomes) que les implants d'embryons de pleurodele (20 % des tératomes).

Fig. 29 Chimère allogénique à corps double *T. alpestris* × *T. alpestris* (alp. alp.) de la combinaison hétérosexuée mâle antérieur (♂ -♂) testicules antérieurs (t a) et ovaires postérieurs (o p) à maturité sexuelle (pas d'effet free-martin, animal hermaphrodite, 22 mois, 110 mm).

Fig. 30 Tolérance d'un ovaire d'axolotl (o Ax) transplanté chez un triton alpestre (39 mois). La transplantation a été faite avec des ovaires d'axolotl juvénile âgé de 5 mois après l'ablation des ovaires du triton alpestre âgé de 8 mois. Malgré la maturité sexuelle de l'ovaire transplanté le triton alpestre ne peut pas pondre les trop gros ovocytes d'axolotl.

Fig. 31. - Tératocarcinome allogénique chez un pleurodele âgé de 17 mois qui avait reçu cinq gastrulas de pleurodele, 13 mois plus tôt au moment de la métamorphose.

Fig. 32. Tératocarcinomes allogéniques chez un axolotl albinos âgé de 11 mois qui avait reçu sept gastrulas d'axolotl albinos, 6 mois plus tôt.

Fig. 33. Tératomes xénogéniques isolés provenant de divers pleurodeles ayant reçu des embryons d'axolotl: (a) tératomes (poids 0,90 g et 0,45 g) provenant d'un pleurodele âgé de 38 mois qui avait reçu trois blastulas d'axolotl albinos, 34 mois plus tôt en fin de métamorphose, (b) tératome (poids 0,50 g) provenant d'un pleurodele âgé de 14 mois qui avait reçu trois embryons d'axolotl sauvage au stade bourgeon caudal jeune, 11 mois plus tôt à l'état larvaire, (c) tératomes (poids 1,10 g et 0,60 g) provenant d'un pleurodele âgé de 37 mois qui avait reçu trois embryons d'axolotl albinos au stade bourgeon caudal âgé, 33 mois plus tôt en fin de métamorphose.

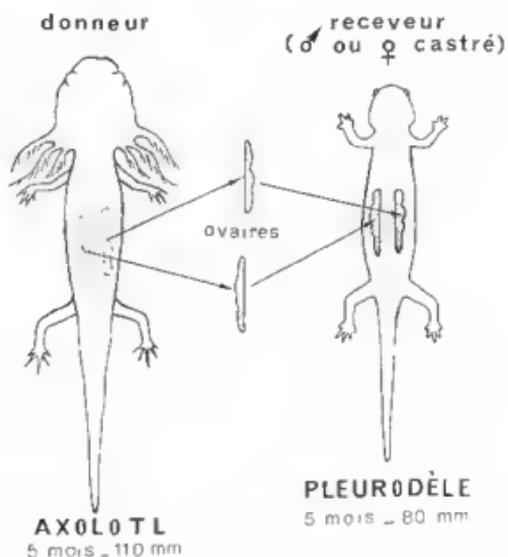


Fig. 34 - Inoculation d'embryons de pleurodèle, ou d'axolotl, dans la cavité générale d'une larve de pleurodèle pour obtenir des tératomes.

Histologiquement, on reconnaît les tissus les plus divers sans organisation et dont l'importance varie selon les tératomes: nodules de cartilage, épithélium intestinal, formations tubulaires comme dans une structure rénale, tissu nerveux, mince épithélium qui limite les vésicules d'ascite, épiderme avec des lambeaux de mue en cours de desquamation, peu de tissu musculaire mais abondant tissu conjonctif dans tous les cas. Dans les tumeurs déstabilisées la nature carcinomateuse est attestée par les nombreuses mitoses, les noyaux pycnotiques à côté des noyaux polylobes avec plusieurs gros nucléoles, l'intense vascularisation et les nombreuses hématies qui infiltrent tous les tissus. La structure histologique bénigne ou maligne varie d'une tumeur à l'autre sans qu'il soit possible d'établir la relation entre le stade de l'implant embryonnaire et l'âge de l'hôte.

TRANSPLANTATIONS OVARIENNES

L'histocompatibilité relative entre les divers urodèles, et plus spécialement l'étonnante tolérance des greffes embryonnaires d'axolotl par les autres, furent mises à profit pour réaliser des transplantations d'ovaires. Le principe de l'intervention consiste dans un premier temps à castrer un animal juvénile, mâle ou femelle, quelques mois après la métamorphose, puis dans



Fig 35 - Xénotransplantation des ovaires d'axolotl dans un pleurodele javemie, mâle ou femelle, qui a été préalablement castré

un deuxième temps à prélever les ovaires d'un animal sensiblement au même âge dont les ovocytes sont en prévitellogénèse pour ensuite implanter ces ovaires dans la cavité générale des receveurs castrés. Les transplants ovariens sont placés dorsalement en position orthotopique de façon à obtenir des adhérences au niveau des zones cicatricielles résultant de la castration (fig. 35). La mortalité post-opératoire est pratiquement nulle. Les animaux opérés poursuivent leur développement normal pour atteindre l'état adulte un à deux ans plus tard.

ALLOGÉNIQUES

Les interventions ont été réalisées à partir de pleurodèles métamorphosés âgés de 4 à 5 mois (65 à 85 mm). Les receveurs castrés sont aussi bien des pleurodèles femelles que des pleurodèles mâles. Seize animaux (8 mâles et 8 femelles) appartenant à la même souche histocompatible furent castrés, la reprise des ovaires fut effective chez tous. Quand il s'agit de pleurodèles standards, qui n'appartiennent pas à des souches histocompatibles, la reprise des allotransplants ovariens intervient dans 85 % des cas aussi bien chez les femelles castrées que chez les mâles castrés. Ces animaux peuvent pondre dès l'âge de deux ans.

La même intervention fut tentée afin de transplanter les ovaires de pleurodèles femelles adultes qui avaient séjourné pendant 12 jours en microgravité dans le biosatellite russe "Cosmos 2229" fin 1992-début 1993 (DOURNON et al., 1997). Ces femelles devaient être nécessairement sacrifiées dès leur retour pour être utilisées par divers expérimentateurs. Une fois prélevés, des fragments d'ovaire furent transplantés dans des pleurodèles mâles ou femelles castrés, juvéniles et adultes. Sur 25 animaux opérés, seulement 7 survécurent aux conditions particulières lors de cette expérience, néanmoins la reprise des allotransplants ovariens adultes fut effective chez 6 pleurodèles.

XÉNOGÉNIQUES

Le protocole opératoire ci-dessus fut appliqué pour transplanter des ovaires d'axolotl chez le pleurodele (HOULLON, 1972) et chez le triton alpestre (HOULLON, 1975), de même que pour des transplants ovariens entre le pleurodele et le triton alpestre. Pour les transplantations d'ovaires d'axolotl, les donneurs sont âgés de 5 à 6 mois (100 mm) et les pleurodèles ou les

tritons alpestres receveurs sont âgés de 7 à 9 mois. Sur 124 pleurodèles castrés et transplantés avec des ovaires d'axolotl, 34 mâles sur 55 et 41 femelles sur 69 ont présenté plus tard des ovaires d'axolotl. La plupart de ces ovaires ont atteint la maturité sexuelle de sorte que des pleurodèles ont pondu systématiquement des oeufs d'axolotl.

La reprise effective des ovaires d'axolotl fut également observée chez des tritons alpestres castrés (4 mâles sur 4 et 4 femelles sur 7). Cependant, bien que les ovaires aient atteint la maturité sexuelle, les tritons alpestres n'ont jamais pu pondre d'oeufs d'axolotl car les ovocytes d'axolotl sont trop volumineux pour pouvoir transiter dans les oviductes de triton alpestre (fig. 30).

Les xénotransplants ovariens entre le pleurodèle et le triton alpestre sont tolérés mais avec un succès très variable selon le sens de la transplantation. Le triton alpestre tolère assez bien les xénotransplants ovariens de pleurodèle (10 cas sur 24) mais les ovocytes de pleurodèle ne peuvent pas transiter dans les oviductes du triton alpestre. En revanche, la tolérance du pleurodèle pour les xénotransplants ovariens de triton alpestre est très faible (3 cas sur 26) mais il a pu être obtenu l'émission d'oeufs de triton alpestre par un pleurodèle.

En plus des transplantations d'ovaires, quelques xénotransplantations de testicules juvéniles d'axolotl ont été tentées avec succès dans des pleurodèles juvéniles castrés sans espoir pourtant d'obtenir l'émission de spermatozoïdes hétérologues puisque le rétablissement des connexions anatomiques pour l'émission des gamètes mâles est inconcevable chez les amphibiens. C'est ainsi que chez 15 pleurodèles, dont 10 mâles castrés sur 12 et 5 femelles castrées sur 5, des testicules d'axolotl furent tolérés et atteignirent la maturité sexuelle.

Les oeufs d'axolotl pondus par le pleurodèle ont un développement en apparence normal quand ils peuvent être fécondés artificiellement par des spermatozoïdes d'axolotl. Il en est de même pour les oeufs de triton alpestre pondus par le pleurodèle quand ils peuvent être fécondés artificiellement par des spermatozoïdes de triton alpestre. Cependant dans les deux cas, l'étude du développement n'a pas été envisagée d'une manière approfondie.

AUTRES INTERVENTIONS EMBRYONNAIRES

En utilisant toujours *P. naltl* comme matériel biologique, les autres expérimentations ci-dessous furent réalisées.

ORGANOGENESE DE LA GONADE

Le blocage unilatéral de l'uretère primaire (canal de Wolff) au stade du jeune bourgeon caudal avant sa croissance provoque l'absence de mésonephros du même côté. Les cellules germinales primordiales se mettent en place normalement, mais en absence de la médulla gonadique qui provient du blastème mésonephrétique les cellules germinales non seulement

ne prolifèrent pas, mais dégèrent. L'absence de mésonephros a pour conséquence l'agénésie et même l'absence de glande génitale (HOUILLON, 1956).

FORMATION DU CANAL DE MÜLLER

L'ablation précoce du pronéphros provoque l'absence du canal de Müller. Toute absence locale ou déviation du canal de Wolff se traduit par une absence ou une déviation comparable du canal de Müller. La formation du canal de Müller est liée à la présence du pronéphros et au voisinage ininterrompu de son extrémité en voie de croissance avec le canal de Wolff qui lui sert de guide pour atteindre le cloaque (HOUILLON, 1959).

INVERSION DU PHÉNOTYPE SEXUEL FEMELLE PAR LA TEMPÉRATURE

Chez le pleurodèle, le déterminisme génétique du sexe obéit au mécanisme mâle ZZ-femelle ZW (hétérogamétie femelle). L'élevage des larves à la température du laboratoire ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) donne une sex-ratio normale : 50 % de mâles et 50 % de femelles. Des larves ZW, élevées à la température de 32°C jusque peu avant la métamorphose, se différencient en mâles (thermo-néo-mâles) dans 100 % des cas. L'inversion du phénotype sexuel de ces larves a été prouvée par diverses analyses génétiques, notamment par l'étude de la descendance issue du croisement entre une femelle standard ZW et un "thermo-neo-mâle ZW". Comme attendu, de tels croisements ont donné, à la température du laboratoire, 25 % de mâles et 75 % de femelles dont 25 % de femelles WW viables (HOUILLON & DOURNON, 1978; DOURNON & HOUILLON, 1984, 1985; DOURNON et al., 1990).

CLONAGE DU PLEURODÈLE À PARTIR DU NOYAU DES CELLULES GERMINALES

La greffe nucléaire fut appliquée au pleurodèle au début des années 60 (SIGNORIT & PICHIRAI, 1962). Cependant, seuls les noyaux prélevés au stade de la blastula permettent d'obtenir un développement normal jusqu'à l'état adulte. Les noyaux prélevés à des stades ultérieurs conduisent à des développements s'interrompant d'autant plus tôt que l'embryon donneur est plus âgé; aucun développement n'est obtenu à partir du bourgeon caudal. Et pourtant, les noyaux des cellules germinales, qui ne sont identifiables dans les crêtes génitales que peu après l'éclosion (larves de 15 jours), conduisent à des développements complets. La totipotence des noyaux germinaux persiste au moins jusqu'à la métamorphose. On peut encore cloner le pleurodèle avec des noyaux issus de cellules germinales prélevées directement dans les testicules ou les ovaires d'animaux âgés de quatre mois et obtenir des pleurodèles adultes capables de se reproduire (LISIMPI et al., 1987). À ce jour, pour réussir le clonage, tant chez les amphibiens que chez les mammifères, avec des noyaux de cellules embryonnaires âgées ou avec des noyaux de cellules somatiques différenciées, il est nécessaire que ces noyaux aient subi au préalable un traitement particulier (reprogrammation).

EXPÉRIENCE "FERTILE"

Depuis l'apparition de la vie sur notre planète, les organismes vivants ont évolué, se sont développés et adaptés à la gravitation terrestre (g_1). Le développement d'un vertébré est-il possible en apesanteur (g_0)? Des avril 1987, nous avons soumis au Centre National d'Etudes Spatiales (CNES) un projet destiné à l'étude de la fécondation et du développement du pleurodele dans l'espace. Le laboratoire de Biologie du Développement de Toulouse (Mme A-M Duprat) y fut associé fin 1987 ainsi que le laboratoire de Biologie expérimentale et Immunologie de Nancy (Prof. C. Dournon) à partir de 1989. La mise au point du projet a nécessité la résolution de nombreux problèmes liés aux contraintes des vols spatiaux, en particulier l'obtention certaine d'une ponte à un moment précis et la survie d'embryons dans le milieu aquatique nécessairement très réduit. L'expérience FERTILE (Fécondation et Développement du Triton dans l'Espace) s'est déroulée dans la station MIR en 1996 avec la participation de la Cosmonaute française Claude André-Deshays. Cette expérience fut reprise au printemps 1999 dans la même station orbitale avec la participation de Jean-Pierre Haigroner.

Les résultats essentiels sont que la fécondation s'avère possible et que le développement ne semble guère perturbé par l'absence de pesanteur durant une dizaine de jours. Des pleurodèles conçus dans l'espace, et qui ont débuté leur développement en microgravité jusqu'à un stade proche de l'éclosion, atteignent maintenant l'âge adulte et peuvent se reproduire.

CONCLUSIONS

Les résultats des interventions embryonnaires rapportées posent autant de problèmes qu'ils en résolvent, mais n'est-ce pas le propre de toute expérimentation biologique en raison de la complexité des phénomènes vitaux? L'intérêt des xénogreffes embryonnaires est d'avoir mis en évidence des degrés d'histocompatibilité entre différentes espèces, ce qui permet une comparaison phylogénétique autre que celle basée sur les caractères anatomiques. Cette histocompatibilité relative est corroborée par les parabioses et les chimères. L'étude de la viabilité de ces animaux expérimentaux devrait permettre une nouvelle approche des phénomènes immunitaires encore peu connus pour les xénogreffes. La reconnaissance d'un "soi xénogénique" au cours de la période d'acquisition de la maturité immunologique. L'axolotl, donneur universel de xénogreffes, est un cas étonnant qui pourrait s'interpréter par ses caractères primitifs: il ne posséderait que les antigènes de transplantation communs à tous les autres urodeles. Et si chez les mammifères il pouvait se trouver un tel donneur universel? Quel merveilleux matériel ce pourrait être pour les xénotransplantations d'organes.

La parabiose, qui est la réalisation expérimentale du free martinisme des bovidés, trouve avec les associations xénogéniques une nouvelle approche qui met davantage l'accent sur l'énigmatique effet de position dans les interactions gonadiques chez les chimères hétérosexuées. L'absence d'interprétation ne peut qu'inviter à poursuivre l'expérimentation.

La plus ou moins grande viabilité des chimères xénogéniques implique des mécanismes immunologiques encore inconnus. Après une évolution apparemment normale durant plusieurs mois, certaines périssent brutalement en quelques jours, d'autres s'amaigrissent lentement mais inexorablement pour atteindre un état de cachexie extrême; une troisième catégorie présente des plages de nécrose incurable au niveau de l'une des hémiparties: il s'agit en l'occurrence d'une véritable maladie auto-immune, où tout se passe comme si la partie saine rejetait l'autre. Enfin pourquoi une quatrième catégorie de chimères demeurent-elles viables sans jamais présenter de signe pathologique?

La faible antigénicité des ovaires révélée par les allo- et les xénotransplantations n'a guère été envisagée pour les vertébrés supérieurs et l'éthique ne permet pas de songer à une application pour remédier à la stérilité féminine! Mais pourtant, l'accroissement des ovocytes dans un organisme étranger est-il vraiment sans influence sur le développement ultérieur? Serait-il abusif de parler ici de tentative de transgénèse par le biais d'informations étrangères qui s'intégreraient dans l'ovocyte au cours de son accroissement?

D'une particulière originalité, les tératocarcinomes expérimentaux ne sauraient laisser indifférent compte tenu de leurs implications chez les mammifères. Quand, comment et pourquoi certaines cellules deviennent-elles malignes? Ces questions font partie des préoccupations les plus actuelles concernant les relations entre cellules embryonnaires et cellules tumorales.

Enfin, pour revenir à l'organogenèse initiale des gonades, quels sont les facteurs de croissance pour les cellules germinales primordiales qui, émanant du blastème mesonéphrétique, permettent leur persistance et leur prolifération? Pourquoi la prolifération rapide des cellules germinales primordiales est-elle le premier indice de la différenciation ovarienne alors qu'une prolifération lente conduira à une différenciation testiculaire?

Et c'est ainsi qu'à travers des manipulations, classiques pour quelques-unes, originales pour la plupart, les amphibiens gardent tout leur intérêt comme matériel expérimental de choix, sans oublier les aspects moléculaires envisagés ces dernières décennies, pour aborder avec profit l'embryologie du 21^e siècle.

RÉSUMÉ.

Des interventions aux stades embryonnaires ont été réalisées entre sept espèces d'amphibiens urodeles, *Pleurodeles waltl*, *Pleurodeles poireti*, *Triturus alpestris*, *Triturus helveticus*, *Triturus vulgaris*, *Triturus cristatus* et *Ambystoma mexicanum*.

La tolérance ou le rejet des greffes de téguments embryonnaires dépend du degré d'histocompatibilité entre les sept espèces. L'axolotl se comporte comme un "donneur universel" pour les autres urodeles. La tolérance des ébauches gonadiques présomptives permet d'obtenir l'émission d'œufs d'une espèce par une autre espèce.

La survie des parabioses xénogéniques confirme l'histocompatibilité relative observée avec les greffes de tégument. La métamorphose de l'axolotl en parabiose avec un triton est provoquée par l'hypersecretion thyroïdienne du triton.

Sur 49 associations en chimères théoriquement concevables entre les embryons des sept espèces, 4 associations allogéniques (chimères entre embryons de la même espèce) ont effectivement été réalisées (plus de 570 chimeres âgées de 4 mois à 15 ans) et 23 associations xénogéniques (chimères entre embryons d'espèces différentes) ont été réalisées (536 chimères âgées de 3 mois à 7 ans). Les chimères allogéniques sont viables au même titre que les animaux standards. Les chimères à corps double sont pourvues de deux paires de gonades. Dans les combinaisons homosexuelles, les animaux ont soit quatre ovaires soit quatre testicules fonctionnels (chimères germinales). Dans les combinaisons hétérosexuées, les interactions entre gonades de sexes différents dépendent de leur position relative. L'effet free-martin (inhibition et même inversion des ovaires) s'observe lorsque les ovaires sont antérieurs par rapport aux testicules, l'effet free-martin est faible et même souvent nul lorsque les ovaires sont postérieurs par rapport aux testicules; dans ce cas l'évolution des ovaires postérieurs est peu modifiée par les testicules antérieurs.

La survie des chimères xénogéniques dépend des espèces associées et du sens de l'association. Les chimeres xénogéniques qui atteignent l'état adulte peuvent manifester le comportement sexuel de l'espèce qui constitue sa partie antérieure et de l'espèce qui constitue sa partie postérieure.

Les urodèles, qui ne présentent qu'exceptionnellement des tumeurs spontanées, développent des tératomes après l'implantation d'embryons, allogéniques ou xénogéniques, dans la cavité générale des jeunes larves. Certaines de ces tumeurs expérimentales restent bénignes mais d'autres se déstabilisent pour devenir des tératocarcinomes.

Les ovaires prélevés chez des animaux juvéniles et transplantés dans des jeunes animaux, mâles ou femelles castrés, peuvent être indéfiniment tolérés même quand il s'agit de xéno-transplants.

La tolérance des ovaires d'axolotl par le pleurodèle permet l'émission systématique d'œufs d'axolotl par le pleurodèle. Après fécondation artificielle, les ovocytes, qui ont effectué tout leur accroissement dans un organisme étranger, ont un développement en apparence normal.

L'histocompatibilité relative des xéngreffes embryonnaires, la survie des parabioses et des chimères xénogéniques, l'effet free-martin de position dans les interactions entre glandes génitales, la formation et la déstabilisation des tératomes expérimentaux sont autant de phénomènes originaux qui demeurent énigmatiques.

REMERCIEMENTS

Grâce à la bienveillance du Professeur Alain Dubois et à l'aide efficace de Mme Annemarie Ohler, la plupart des pièces anatomiques correspondant aux expériences rapportées ont pu être classées et conservées en zoothèque au laboratoire des Reptiles et Amphibiens du Muséum national d'Histoire naturelle de Paris, où elles sont enregistrées sous les numéros de collection MNHN 1997 6600-8200.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BORN, G., 1897 Über Verwachsungsversuche mit Amphibienlarven *Roux's Arch. Entom.*, **4** 349-365
- BRIGGS, R. & KING, J.T., 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc. natn. Acad. Sci. USA*, **38**: 455-463.
- BURNS, R. K., 1925 The sex of parabiotic twins in Amphibia *J. exp. Zool.*, **42** 31-89
- CHABRY, L., 1887 Contribution à l'embryologie normale et tératologique des ascidies simples. *J. Anat. Physiol.*, **23**, 167.
- CHARIEMAGNE, J. & HOUILLON, C., 1966 Activités thyroïdiennes au cours de la métamorphose chez les urodèles associés en parabiose. *C. r. Acad. Sci. Paris*, (D), **262**: 897-900
- 1974 Analyse morphologique des chimères obtenues par greffes embryonnaires chez les amphibiens urodèles. *J. Embry. exp. Morph.*, **31** 263-286
- DOURNON, C., AIMAR, C., BAUTZ, A., ROPARS, A. & HOUILLON, C., 1997 Grafts of ovaries in males and females of *Pleurodeles waltli* (Urodela, Amphibia): evidence of a long-term tolerance of allografts, application following a space biology experiment *Repr. Nutr. Dév.*, **37** 637-649
- DOURNON, C. & HOUILLON, C., 1984 Démonstration génétique de l'inversion fonctionnelle du phénotype sexuel femelle sous l'action de la température d'élevage chez l'amphibien urodèle. *Pleurodeles waltli* Michah. *Repr. Nutr. Dév.*, **24** (4): 361-378.
- 1985 Thermosensibilité de la différenciation sexuelle chez l'amphibien urodèle. *Pleurodeles waltli* Michah. Conditions pour obtenir l'inversion du phénotype sexuel de toutes les femelles génétiques sous l'action de la température d'élevage. *Repr. Nutr. Dév.*, **25** (4A): 679-688.
- DOURNON, C., HOUILLON, C., & PHAL, C. 1990 Temperature sex-reversal in amphibians and reptiles. *Int. J. dev. Biol.*, **34**, 81-92
- DRISCH, H., 1891 Entwicklungsmechanische Studien. I. Der Werth der beiden ersten Furchungszellen in der Echinodermmentwicklung. Experimentelle Erzeugung von Theil- und Doppelbildungen. *Z. wiss. Zool.*, **53** 160-182
- HOUILLON, C., 1956 Recherches expérimentales sur la dissociation médullo-corticale dans l'organogenèse des gonades chez le triton *Pleurodeles waltli* Michah. *Bull. biol. Fr. Belg.*, **90** 360-445
- 1959 Analyse expérimentale des relations entre le canal de Wolff et le canal de Müller chez le triton *Pleurodeles waltli* Michah. *Bull. biol. Fr. Belg.*, **93**: 289-314
- 1964a Chimères xenoplastiques entre les urodèles *Pleurodeles waltli* Michah et *Triturus alpestris* Laur. *C. r. Acad. Sci. Paris*, (12), **258** 3901-3903
- 1964b Nouvelles chimères xenoplastiques chez les urodèles: combinaisons viables et letales. *C. r. Acad. Sci. Paris*, (12), **258**, 5725-5728
- 1965 Associations en chimères entre l'axolotl et diverses espèces de triton. *C. r. Acad. Sci. Paris*, (12), **261**: 246-248
- 1966 Métamorphose et tolérance dans la parabiose hétérogène chez les urodèles. *C. r. Acad. Sci. Paris*, (D), **262**, 136-138
- 1967 Greffes embryonnaires de peau entre *Ambystoma mexicanum* Shaw, *Pleurodeles waltli* Michah et *Triturus alpestris* Laur., phénomènes de tolérance et de rejet. *C. r. Acad. Sci. Paris* (D) **264** 834-837.
- 1972 Tolerance des greffes ovariennes entre espèces différentes chez les amphibiens urodèles, conséquences sur l'émission de pontes hétérologues. *C. r. Acad. Sci. Paris*, (D) **274** 2790-2793
- 1973 Greffes de gonades entre les amphibiens urodèles, *Pleurodeles waltli* Michah et *Ambystoma mexicanum* Shaw, conséquences sur l'émission de pontes hétérologues. *C. r. Acad. Sci. Paris* (D), **277**: 2245-2248
- 1975 Evolution des xenogreffes de gonades embryonnaires et des ovaires juvéniles de *Ambystoma mexicanum* Shaw, transplantées sur *Triturus alpestris* Laur. *C. r. Acad. Sci. Paris* (D), **281** 171-174
- 1977 Tractus uro-génital des chimères chez l'amphibien urodèle, *Triturus alpestris* Laur. *J. Embry. exp. Morph.*, **42** 15-28
- 1984 - Chimères viables obtenues à partir de trois tronçons provenant de trois embryons différents chez l'amphibien urodèle *Ambystoma mexicanum* Shaw. *C. r. Acad. Sci. Paris*, (3), **299**: 25-30

- 1988 Production de teratomes à partir d'implants embryonnaires allogéniques chez l'amphibien urodèle, *Pleurodeles waltli* Michah. *C r Acad Sci Paris*, (3), **306**: 213-219
- 1989 Teratomes expérimentaux à partir d'implants embryonnaires xénogéniques chez l'amphibien urodèle, *Pleurodeles waltli* Michah. *C r Acad Sci Paris*, (3), **308**: 229-236
- 1992 - Reproduction et comportement sexuel chez les urodèles chimères. *Bull Soc zool Fr*, **117**(2), 179-187
- 1999 Les urodèles chimères. I Aspect morphologique. *Bull Soc zool Fr*, **124** 3-37
- 2000 Les urodèles chimères. II Tractus uro-génital. *Bull Soc zool Fr*. **125** 87-130
- HOUILLOU, C & BAGNARA, J T. 1996 Insights in pigmentary phenomena provided by grafting and chimera formation in the axolotl. *Pigment Cell Res*, **9** 281-288.
- HOUILLOU, C & CHARLEMAGNE, J. 1971 Développement d'un double système de glandes génitales dans les chimères homoplastiques à corps double chez l'amphibien urodèle, *Pleurodeles waltli* Michah. *C r Acad Sci Paris*, (D), **272** 1546-1549
- HOUILLOU, C, CHARLEMAGNE, J. & GOUJON P. 1973 Hermaphrodisme des chimères allogéniques chez l'amphibien urodèle, *Pleurodeles waltli* Michah. *C r Acad Sci Paris*, (D), **276** 1617-1620
- HOUILLOU, C & DOIRON, C., 1978. Inversion du phénotype sexuel femelle sous l'action d'une température élevée chez l'amphibien urodèle, *Pleurodeles waltli* Michah. *C r Acad Sci Paris*, (D), **286**. 1475-1478
- 1986. Evolution du tractus uro-génital chez les pleurodeles chimères à corps double Effet de position dans les interactions entre glandes génitales de sexe différent. *Repr Nutr Dev*, **26** (5A) 1115-1135.
- HOUILLOU, C, TOURNIEER, A & CHARLEMAGNE J. 1969. Antigenicité relative des hétérogreffes embryonnaires de tégument chez les amphibiens urodèles *Ambystoma mexicanum* Shaw, *Triturus helveticus* Raz., *Triturus alpestris* Laur et *Pleurodeles waltli* Michah. *C r Acad Sci Paris*, (D), **268**, 2982-2985
- LESIMPLE, M., DOIRON, C. & HOUILLOU, C. 1990. Melanin as a natural germ cell marker for intraspecific experiments in *Ambystoma mexicanum* (Urodela, Amphibia). *Roux's Arch des Biol* **198**: 420-429
- LESIMPLE, M., DOIRON, C., LABROUSSE, M & HOUILLOU, C. 1987. Production of fertile salamanders by transfer of germ cell nuclei into eggs. *Development*, **100**: 471-477.
- LILLIE, F R., 1916. - The theory of the free-martin. *Science*, **43**, 161.
- MINIZ, B., 1962. - Formation of genotypically mosaic mouse embryos. *Am. Zool*, **2**, 432
- PLACAIS, D., 1974. Transplantation d'une tumeur spontanée découverte chez l'amphibien urodèle, *Pleurodeles waltli* Michah. *Bull. Soc. zool Fr.*, **99** 283-295
- ROUX W. 1895. Über die verschiedene Entwicklung isolierter erster Blastomeren. *Roux's Arch Entw.* **1** 596
- SIGNORIET J & PICHÉRAL B. 1962. Transplantation de noyaux chez *Pleurodeles waltli* Michah. *C r Acad Sci Paris*, **254** 1150-1151
- SPEMANN H. 1901. Ueber Korrelationen in der Entwicklung des Auges. *Verh Anat Ges.* **15** 61-79
- 1921. Die Erzeugung tierischer Chimären durch heteroplastische embryonale Transplantation zwischen *Triton cristatus* und *taenarius*. *Roux's Arch Entw.*, **48**, 533-570
- TARKOWSKI, A. K. 1961. Mosaic chimaeras developed from fused eggs. *Nature* **190** 857-860

Corresponding editor: Alain Dubois